苘麻叶总鞣质的提取工艺及抗氧化活性研究

杨 杰 陈晓云 郭玉茹 高 翔 田春莲* 刘明春

（沈阳农业大学畜牧兽医学院，沈阳 110866）

摘 要：为研究苘麻叶总鞣质的提取工艺及抗氧化活性，本研究通过单因素试验和响应面试验优化苘麻叶总鞣质的提取工艺，同时采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）自由基清除法、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐（ABTS）自由基清除法和铁离子还原/抗氧化能力（FRAP）测定法等评价苘麻叶总多酚、不被吸附的多酚和总鞣质的体外抗氧化活性。结果表明，苘麻叶总鞣质的最佳提取工艺为：丙酮浓度 70%、液料比（*V*/*m*）15.25:1.00、提取时间 20 min；在此工艺条件下，8 月份、9 月份和 10 月份采收的苘麻叶总鞣质的含量分别为（1.41±0.05）‰、（1.77±0.03）‰和（1.49±0.03）‰；苘麻叶总鞣质具有较好的体外抗氧化活性。本研究得出了苘麻叶总鞣质的高效提取工艺，且提取的总鞣质具有较好的抗氧化活性。

关键词：苘麻叶；总鞣质；提取工艺；响应面；抗氧化活性

中图分类号：S816.7

苘麻(*Abutilon theophrasti* Medic.)为锦葵科苘麻属植物苘麻的全草或叶[1]，具有清热利湿，解毒开窍之功效，常用于痢疾、中耳炎、耳鸣、耳聋、化脓性扁桃体炎和痈疽肿毒等疾病的治疗。苘麻中含有黄酮、多酚、鞣质、有机酸等化学成分。目前关于苘麻黄酮和多酚的研究较多，但鞣质的相关研究鲜有报道。鞣质类成分具有较好的收敛作用，可以用于溃疡、腹泻、创伤、灼伤等的治疗[2]。此外，鞣质还有局部止血、抑菌抗炎、抗病毒、抗氧化、抗变态反应、抗炎、驱虫、降血压等作用[3-8]。近年来，随着畜牧业集约化和规模化的发展，氧化应激给畜禽带来的危害日益严重[9]；此外，随着人工合成抗氧化剂副作用报道的不断增加，天然抗氧剂逐渐引起了相关研究者的关注。本试验以苘麻叶为研究对象，

收稿日期：2017-11-28

基金项目：国家自然科学基金（31402252）；沈阳农业大学青年基金（20131001）

作者简介：杨 杰（1993-），女，河北沧州人，硕士研究生，研究方向为兽医药理与毒理。E-mail: 15802443206@163.com

*通信作者：田春莲，讲师，硕士生导师，E-mail: tianchunlian823@163.com

采用超声波辅助提取方法结合单因素试验和响应面试验考察了总鞣质的提取工艺，并评价了其抗氧化活性，以期为天然抗氧剂的研究和开发奠定一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

苘麻叶采收自吉林省通榆县开通镇，采收后清洗干净，置阴凉处自然干燥，保存备用。

没食子酸标准品购自中国药品生物制品检定所（批号：110831-200302）。

钨酸钠购于天津市瑞金特化学品有限公司；钼酸钠、硫酸锂购自天津市博迪化工股份有限公司；干酪素购自北京奥博星生物技术有限责任公司；其他分析试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品溶液的制备

精确称取药材粉末 0.5 g 置于 100 mL 三角瓶中，加入溶剂，与样本混合；不同条件下超声提取；冷却静置(每个样品提取 2 次)，过滤，合并 2 次滤液，离心，浓缩至近干，加水溶解并稀释至 10 mL。

1.2.2 单因素试验

单因素试验考察提取时间、液料比和丙酮浓度 3 个因素对苘麻叶总鞣质提取效果的影响，以苘麻叶总鞣质提取率为考察指标，分别考察 3 个因素的不同水平。各因素的考察水平如下：提取时间（10、15、20、25、30 min）、液料比（*V*/*m*）（10.00:1.00、15.00:1.00、20.00:1.00、25.00:1.00、30.00:1.00）、丙酮浓度（20%、40%、60%、80%、100%）[10]。考察任一因素对苘麻叶总鞣质提取率的影响时，其他 2 个因素置于中间水平（提取时间 20 min、液料比 20.00:1.00、丙酮浓度 60%），每个试验平行 3 次。

1.2.3 响应面试验

在单因素试验的基础上，采用 Design expert 8.0 统计软件，进行响应面试验设计及分析。根据响应面试验设计原理，选取丙酮浓度（A）、液料比（B）和提取时间（C）3 个因素为自变量，以苘麻叶总鞣质提取率为考察指标。

1.2.4 苘麻叶总鞣质的含量测定

1.2.4.1 没食子酸标准曲线的制作 参考《中华人民共和国兽药典》附录 135《鞣质含量测定法》[11]，配制 0.05 mg/mL 的没食子酸标准液，并绘制吸光度（A）与浓度（c）的标准曲线，得到以下回归方程：

$$A=0.170\,9c+0.001\,1（r=0.999\,9）。$$

结果表明，鞣质在 1~10 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

1.2.4.2 鞣质的含量测定 参考《中华人民共和国兽药典》附录 135《鞣质含量测定法》[11]，按照以下公式计算苘麻叶总鞣质含量：

苘麻叶总鞣质含量=总酚量-不被吸附的多酚量。

1.2.5 苘麻叶总鞣质体外抗氧化试验

1.2.5.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）自由基清除能力测定 参考 Tian 等[12]的方法，同时做适当的修改，分别取 10、20、40、80、100 μL 样品溶液，加 900 μL 0.1 mmol/L DPPH 工作液，再加蒸馏水至终体积 1 mL，37 ℃混匀，避光反应 30 min，517 nm 处测定其吸光度值（A_S）；精确量取 10、20、40、80、100 μL 样品溶液，再加蒸馏水至终体积 100 μL，517 nm 处测定其吸光度值（A_0），同时取 100 μL 蒸馏水，加 900 μL DPPH 工作液，37 ℃混匀，避光反应 30 min，517 nm 处测定其吸光度值（A_C）。同时以 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)作为阳性对照，按照以下公式计算自由基清除率：

$$清除率（\%）=[1-（A_S-A_0）/A_C]\times100。$$

清除率达 50%时的 DPPH 自由基浓度为 DPPH 自由基半数清除浓度（IC_{50DPPH}）。

1.2.5.2 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐（ABTS）自由基清除能力测定 参考 Tian 等[12]的方法，同时做适当的修改，将 7 mmol/L 的 ABTS 溶液与 4.9 mmol/L 过硫酸钾溶液等体积混合后，室温条件下避光放置 12~16 h，形成 ABTS 储备液。次日，用磷酸盐缓冲液将 ABTS 储备液稀释成在 734 nm 下吸光度值为 0.70±0.02 的 ABTS 工作液。精确量取 10、20、40、80、100 μL 样品溶液，加 900 μL ABTS 工作液，再加蒸馏水至终体积 1 mL，室温下避光反应 30 min，734 nm 处测定其吸光度值（A_S）；精确量取 10、20、40、80、100 μL 样品溶液，再加蒸馏水至终体积 100 μL，734 nm 处测定其吸光度值（A_0）；同时精确量取 100 μL 蒸馏水，加入 900 μL ABTS 工作液，室温下避光反应 30 min，734 nm

处测定其吸光度值（A_C），同时以 BHT 作为阳性对照，自由基清除率计算方法及公式参考 1.2.5.1。清除率达 50%时的 ABTS 自由基浓度为 ABTS 自由基半数清除浓度（IC_{50ABTS}）。

1.2.5.3 铁离子还原/抗氧化能力（FRAP）的测定 参考 Olszowy 等[13]的方法，同时做适当的修改，取浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 硫酸铁（$FeSO_4$）溶液各 150 µL，分别加入 4.5 mL 的 FRAP 试剂[FRAP 工作液由 300 mmol/L pH 3.6 的醋酸盐缓冲液、10 mmol/L 三吡啶基三嗪(TPTZ)溶液与 20 mmol/L 氯化铁溶液以体积比 10:1:1 混合而成，现用现配]，37 ℃水浴 10 min，于 593 nm 处测定吸光度值，以吸光度值为横坐标，$FeSO_4$ 浓度为纵坐标制作标准曲线。按标准曲线制作方法，以样品溶液代替 $FeSO_4$ 溶液测定吸光度值。FRAP 值以达到同样吸光度值所需的 $FeSO_4$ 的物质的量[mmol/(µg · mL)]表示，样品的 FRAP 越大表示其抗氧化活性越高。

1.3 数据处理与统计分析

采用 Design expert 8.0 软件分析响应面试验数据；采用 SPSS 17.0 软件中的方差分析(Analysis of Variance, ANOVA)对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 丙酮浓度对苘麻叶总鞣质提取率的影响

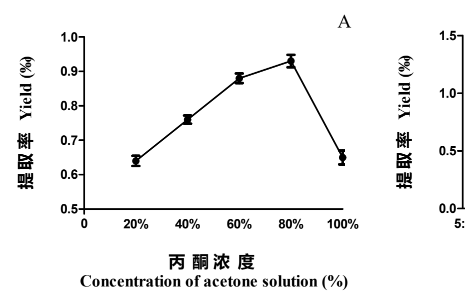
由图 1-A 可以看出，随着丙酮浓度的提高，苘麻叶总鞣质的提取率增加，当丙酮浓度为 80%时，总鞣质的提取率最高，继续提高丙酮的浓度，提取率反而下降。故丙酮浓度选择 80%较为理想。

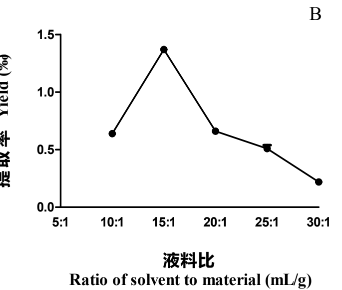
2.1.2 液料比对苘麻叶总鞣质提取率的影响

由图 1-B 可以看出，随着液料比的增加，苘麻叶总鞣质提取率随之上升，当液料比为 15.00:1.00 时总鞣质提取率最高，液料比继续增加时总鞣质提取率转而下降。因此，液料比选择 15.00:1.00 较为适宜。

2.1.3 提取时间对苘麻叶总鞣质提取率的影响

由图 1-C 可以看出，随着超声时间的增加，苘麻叶总鞣质提取率逐渐上升，超声时间为 15 min 时总鞣质提取率最高，之后总鞣质提取率随超声时间的增加反而下降。因此，超声时间选择 15 min 较合适。





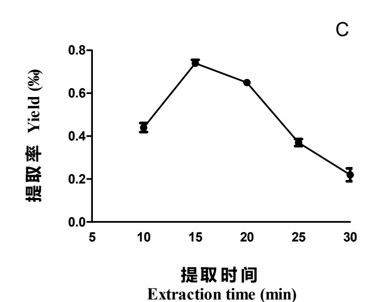


图 1 丙酮浓度（A）、液料比（B）和提取时间（C）对苘麻叶总鞣质提取率的影响

Fig.1 Effects of concentration of acetone solution（A）, ratio of solvent to material（B） and extraction time （C） on the yield of total tannins from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面设计方案及试验结果分析

在单因素试验的基础上，采用 Design expert 8.0 统计软件，根据响应面试验设计原理，选取丙酮浓度、液料比和提取时间 3 个因素为自变量，以苘麻叶总鞣质提取率为响应值，进行试验设计及响应面分析，各因素和水平见表 1。利用 Design expert 8.0 软件得出的试验设计及响应值见表 2。

利用 Design expert 8.0 软件对表 2 中试验所得数据进行回归分析，各因素经回归拟合后，获得以苘麻叶总鞣质提取率为目标函数 Y 的二次多项回归方程如下：

$$Y（\%）=1.07-0.15A+0.022B+0.040C-0.005AB+0.015AC+0.01BC+0.29A^2-0.38B^2+0.18C^2$$。

式中：A 为丙酮浓度(%)；B 为液料比(mL/g)；C 为提取时间(min)。

为考察模型的有效性及各因素对提取率的影响，对该模型进行了方差分析，结果见表 3。由表 3 可以看出，模型 $P<0.000\,1$，表明该二次多项回归模型高度显著，可有效分析自变量与目标函数间的关系；失拟项 $P=0.065\,5$，不显著，表明模型与实际情况拟合较好，此方法可靠可行。因此，可用此模型对试验进行分析和预测。提取时间对鞣质提取率影响极

显著（P＜0.01），丙酮浓度对鞣质提取率影响显著（P＜0.01），液料比对鞣质提取率影响极显著（P＜0.01）；丙酮浓度与提取时间交互作用对提取率影响显著（P＜0.05）；复相关系数（R^2）=0.999 5，说明预测值和实测值之间具有高度的相关性，仅有 0.11%的变异不能由该模型解释[校正相关系数(R^2_{Adj})=0.998 9]。而其他交互项显著性较差，表明试验因素对响应值不是简单的线性关系，而是一种非线性关系。

表 1 响应面试验设计因素和水平

Table 1 Design factors and levels of response surface experiment

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
A	70	80	90
B	10	15	20
C	10	15	20

A：丙酮浓度 concentration of acetone solution(%)；B：液料比 ratio of solvent to material(mL/g)；C：提取时间 extraction time(min)。表 2 和表 3 同。The same as Table 2 and Table 3.

表 2 响应面试验设计及响应值

Table 2 Design and response of response surface experiment

试验号 Test No.	自变量水平 Independent variable levels			响应值 Response
	A	B	C	
1	80	10	20	0.89
2	80	15	15	1.08
3	80	10	10	0.83
4	70	15	10	1.64
5	80	15	15	1.07
6	70	10	15	1.12
7	80	15	15	1.07
8	70	20	15	1.18
9	90	20	15	0.85
10	80	20	20	0.95
11	80	15	15	1.08
12	90	15	10	1.38
13	70	15	20	1.75
14	90	10	15	0.81
15	90	15	20	1.43
16	80	20	10	0.85
17	80	15	15	1.07

表 3 响应面试验结果方差分析

Table 3 Analysis of variance for results of response surface experiments

变异来源 Variation source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F-value	*P* 值 *P*-value

模型 Mode	1.25	9	0.14	1 571.20	＜0.000 1
A	0.19	1	0.19	2 100.56	＜0.000 1
B	0.00	1	0.00	45.73	0.000 3
C	0.01	1	0.01	144.52	＜0.000 1
AB	0.00	1	0.00	1.13	0.323 3
AC	0.00	1	0.00	10.16	0.015 3
BC	0.00	1	0.00	4.52	0.071 2
A^2	0.36	1	0.36	4 081.11	＜0.000 1
B^2	0.60	1	0.60	6 756.56	＜0.000 1
C^2	0.14	1	0.14	1 592.01	＜0.000 1
残差 Residual	0.000 62	7	0.000 088 57		
失拟项 Lack of fit	0.000 5	3	0.000 166 7	5.56	0.065 5
误差 Pure error	0.000 12	4	0.000 03		
总变异 Cor total	1.25	16			
复相关系数 R^2	0.999 5				
校正相关系数 R^2_{Adj}	0.998 9				
预测相关系数 R^2_{Pred}	0.993 5				
信噪比 Adeq precision	129.882				
变异系数 CV/%	0.84				

P<0.05 表示作用显著,P<0.01 为作用极显著。

P<0.05 indicates significant effect, and P<0.01 indicates extremely significant effect.

采用 Design expert 8.0 软件绘制所得响应面和等高线图。由图 2 可以看出，在提取时间一定的条件下，当丙酮浓度保持不变时，提取率随着液料比的增加呈现先升高后降低的趋势，在液料比 15.50:1.00 时达到最大值；当液料比不变时，提取率随丙酮浓度增加先降低后升高，在丙酮浓度 70%时达到最大值。但丙酮浓度与液料比的交互作用对提取率影响不显著(P>0.05)。由图 3 可以看出，在液料比一定的条件下，当丙酮浓度保持不变时，提取率随着提取时间的增长先下降后升高，在提取时间 20 min 时达到最大值；提取时间不变时，提取率随丙酮浓度增加先降低后上升，在丙酮浓度 72%时达到最大值。不过由于等高线比较平缓，丙酮浓度与提取时间的交互作用对提取率影响显著性较低(0.01<P<0.05)。由图 4 可以看出，当丙酮浓度保持不变时，若液料比一定，提取率随着提取时间的增长呈现先降低后升高的趋势，在提取时间 20 min 时达到最大值；若提取时间一定，提取率随丙酮浓度增加先上升后降低，在液料比 15.00:1.00 时达到最大值。但液料比与提取时间的交互作用对提取率影响不显著(P>0.05)。

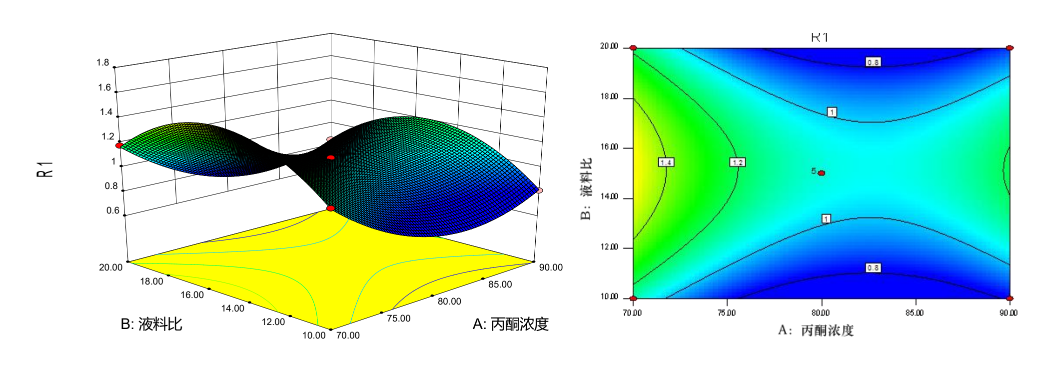


图 2 丙酮浓度与液料比对苘麻叶总鞣质提取率的交互影响

Fig.2 Interation of concentration of acetone solution and ratio of solvent to material on the yield of total tannins from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves

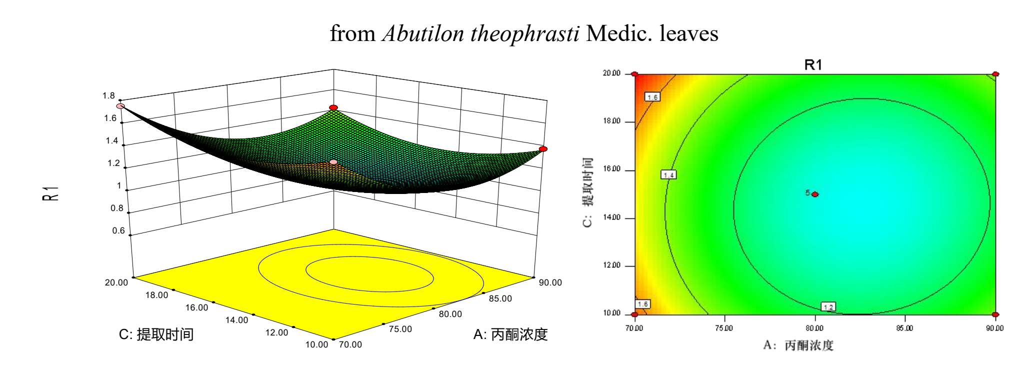


图 3 丙酮浓度与提取时间对苘麻叶总鞣质提取率的交互影响

Fig.3 Interation of concentration of acetone solution and extraction time on the yield of total tannins from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves

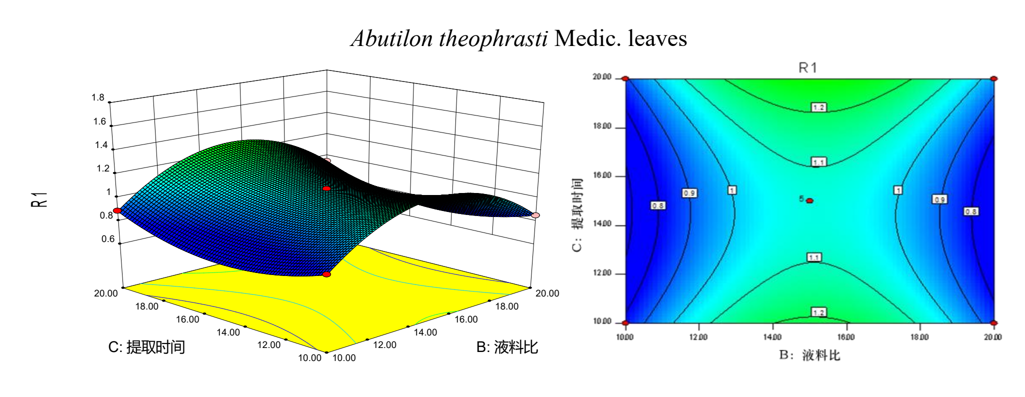


图 4 液料比与提取时间对苘麻叶总鞣质提取率的交互影响

Fig.4 Interation of ratio of solvent to material and extraction time on the yield of total tannins from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves

2.3 最佳工艺条件的确定与验证

由 Design expert 8.0 软件确定的苘麻叶总鞣质最优提取工艺为：丙酮浓度 70%，液料比 15.25:1.00，提取时间 20 min，模型预测的提取率为 1.76‰。为了验证上述模拟最佳试验方案的准确性和提高试验结果的稳定性，将上述得到的最佳处理组合进行了验证试验，

平行 3 次，平均提取率为 1.77‰，实际值与预测值的偏差为 0.568％，表明其相关性良好，说明对苘麻叶总鞣质的提取进行响应面法优化合理可行。在最佳工艺条件下，同年 8 月份、9 月份和 10 月份采收的苘麻叶总鞣质的含量分别为（1.41±0.05）‰、（1.77±0.03）‰和（1.49±0.03）‰。

2.4 抗氧化试验

苘麻叶总多酚、不被吸附的多酚、总鞣质含量及其抗氧化试验结果分别见表 4、表 5、表 6。由表 6 可知，8 月份、9 月份、10 月份采收的苘麻叶总鞣质 $IC_{50\ ABTS}$ 分别为 0.84、0.51、0.35 μg/mL，均低于 BHT 阳性对照的 2.25 μg/mL；同时，DPPH 清除试验和 FRAP 试验结果表明，3 个月份采收的苘麻叶总鞣质的 IC_{50DPPH} 均低于 BHT 阳性对照，FRAP 均高于 BHT 阳性对照。此外，苘麻叶总多酚和不被吸附的多酚的抗氧化活性也较为理想（表 4、表 5）。结果提示，苘麻叶总多酚、不被吸附的多酚和总鞣质均具有较好的抗氧化活性，并且在不同时间采收其抗氧化活性不同，可能与其化学成分种类和含量有关，需待今后的试验进一步验证。

表 4 苘麻叶总多酚含量及其抗氧化试验结果

Table 4 Yield and results of antioxidant test of TPE from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves

样品 Samples	提取物含量 Extract content/%	总多酚含量 Total polyphenol content/‰	ABTS 自由基半数清除浓度 $IC_{50\ ABTS}$/(μg/mL)	DPPH 自由基半数清除浓度 IC_{50DPPH}/(μg/mL)	铁离子还原/抗氧化能力 FRAP/[mmol/(μg・mL)]
8 月份 August	5.91±0.08	9.46±0.15	1.31	10.12	0.21
9 月份 September	6.32±0.06	8.24±0.04	1.53	8.28	0.36
10 月份 October	6.66±0.07	7.04±0.11	1.61	6.09	0.44
2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 BHT			2.25	8.12	0.15

表 5 苘麻叶中不被吸附的多酚含量及其抗氧化试验结果

Table 5 Yield and results of antioxidant test of NAP from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves

样品 Samples	提取物含量 Extract content/%	不被吸附的多酚含量 Non-adsorbed polyphenols/‰	ABTS 自由基半数清除浓度 $IC_{50\ ABTS}$/(μg/mL)	DPPH 自由基半数清除浓度 IC_{50DPPH}/(μg/mL)	铁离子还原/抗氧化能力 FRAP/[mmol/(μg・mL)]
8 月份 August	5.25±0.07	7.96±0.16	1.58	3.75	0.18
9 月份 September	5.76±0.07	6.46±0.04	2.05	1.97	0.27
10 月份 October	6.31±0.08	5.59±0.08	2.03	2.15	0.32
2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 BHT			2.25	8.12	0.15

表 6 苘麻叶总鞣质含量和抗氧化试验结果

Table 6 Yield and results of antioxidant test of TTE from *Abutilon theophrasti* Medic.leaves

样品 Samples	提取物含量 Extract content/%	总鞣质含量 Total tannins content/‰	ABTS 自由基半数清除浓度 $IC_{50\ ABTS}$/(μg/mL)	DPPH 自由基半数清除浓度 IC_{50DPPH}/(μg/mL)	铁离子还原/抗氧化能力 FRAP/[(mmol/(μg・mL)
8 月份 August	0.66±0.02	1.41±0.05	0.84	3.70	0.29
9 月份 September	0.56±0.02	1.77±0.03	0.51	0.85	0.25
10 月份 October	0.35±0.02	1.49±0.03	0.35	1.08	0.22
2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 BHT			2.25	8.12	0.15

2.5 总鞣质含量与氧化活性的相关性分析

2.5.1 苘麻叶中总多酚、不被吸附的多酚和总鞣质的含量与不同方法测定的抗氧化活性的相关性

由表 7 可以看出，苘麻叶中总多酚的含量与 DPPH 法测定其抗氧化活性的相关性显著（P<0.05）。由表 8 可以看出，苘麻叶中不被吸附的多酚含量与 FRAP 法检测其抗氧化活性的相关性极显著（P<0.01）。由表 9 可以看出，苘麻叶中总鞣质的提取物含量与不同方法测定的抗氧化活性的相关性大小为 FRAP>ABTS>DPPH，总鞣质含量与不同方法测定的抗氧化活性的相关性大小为 DPPH>ABTS>FRAP。结果提示，不同种类化合物的抗氧化活性不同，对不同自由基的清除能力或还原能力所有差别。因此，为了客观正确的评价抗氧化活性，要同时选择多种抗氧化活性测定方法。

表 7 苘麻叶中总多酚含量与不同方法测定的抗氧化活性的相关性

Table 7 Correlation between total polyphenol content in *Abutilon theophrasti* Medic. leaves and antioxidant activity determined by different methods

项目 Items	2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 ABTS	1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 DPPH	铁离子还原/抗氧化能力 FRAP	提取物含量 Extract content	总多酚含量 Total polyphenol content
2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 ABTS	1.000	-0.951	0.996	0.978	-0.967
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 DPPH		1.000	-0.975	-0.995	0.998*
铁离子还原/抗氧化能力 FRAP			1.000	0.993	-0.986
提取物含量 Extract content				1.000	-0.999*
总多酚 Total polyphenol content					1.000

*表示显著相关（P＜0.05），**表示极显著相关（P＜0.01）。下表同。

* means significant correlation （P＜0.05）, and ** means extremely significant correlation （P＜0.01）. The same as below.

表 8 苘麻叶中不被吸附多酚含量和不同方法测定的抗氧化活性的相关性

Table 8 Correlation between non-adsorbed polyphenols content in *Abutilon theophrasti* Medic. leaves and antioxidant activity determined by different methods

项目 Items	2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 ABTS	1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 DPPH	铁离子还原/抗氧化能力 FRAP	提取物含量 Extract content	不被吸附多酚含量 Non-adsorbed polyphenols content
2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 ABTS	1.000	-0.999*	0.922	0.835	-0.918
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 DPPH		1.000	-0.900	-0.804	0.895
铁离子还原/抗氧化能力 FRAP			1.000	0.983	-1.000**
提取物含量 Extract content				1.000	-0.985
不被吸附多酚含量 Non-adsorbed polyphenols content					1.000

表 9 苘麻叶中总鞣质含量与不同方法测定的抗氧化活性的相关性

Table 9 Correlation between total tannins content in *Abutilon theophrasti* Medic. leaves and antioxidant activity determined by different methods

项目 Items	2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 ABTS	1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 DPPH	铁离子还原/抗氧化能力 FRAP	提取物含量 Extract content	总鞣质含量 Total tannins content
2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 ABTS	1.000	0.922	0.993	0.921	-0.399
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 DPPH		1.000	0.871	0.698	-0.724
铁离子还原/抗氧化能力 FRAP			1.000	0.960	-0.291
提取物含量 Extract content				1.000	-0.011
总鞣质含量 Total tannins content					1.000

3 讨 论

3.1 苘麻叶总鞣质提取工艺的优化

鞣质类化合物结构中具有较多的羟基，稳定性较差，且其分子质量较大，给提取分离工作带来了一定的难度。因此，优化鞣质的提取工艺对实际生产应用具有重要指导意义[14]。本研究采取单因素试验和响应面试验结合超声提取的方法优化了苘麻叶总鞣质的提取工艺，并获得了最佳提取工艺。

3.2 苘麻叶总鞣质体外抗氧化活性研究

鞣质由于具有较多的酚羟基，故具有较好的清除自由基功能[15-17]。本试验采用 DPPH 自由基清除法、ABTS 自由基清除法、FRAP 测定法检测苘麻叶总多酚、不被吸附的多酚和总鞣质体外抗氧化水平，结果显示三者均具有较强的抗氧化活性。

3.3 苘麻叶总鞣质的含量和抗氧化活性与采收时间的关系

研究表明，中药在不同时间采收直接影响其中的活性物质的产量、品质和提取率[18]。本试验对相同年份不同月份的苘麻叶总鞣质进行了提取，并考察了其体外抗氧化水平，结果显示，同年不同月份采收的苘麻叶总鞣质含量高低次序是 9 月份>10 月份>8 月份。ABTS 自由基清除法和 FRAP 测定法测定结果揭示 8 月份、9 月份、10 月份的苘麻叶总鞣质抗氧化活性逐渐增强，DPPH 自由基清除试验结果则显示不同月份苘麻叶总鞣质的抗氧化活性次序是 9 月份>10 月份>8 月份。故应根据具体用途，选择苘麻叶的最佳采收时间。

4 结 论

① 本试验建立的苘麻叶总鞣质最佳提取工艺条件为：丙酮浓度 70%、液料比（*V*/*m*）15.25:1.00、提取时间 20 min。在此条件下，8 月份、9 月份和 10 月份采收的苘麻叶总鞣质的含量分别为（1.41±0.05）‰、（1.77±0.03）‰和（1.49±0.03）‰。

② DPPH 自由基清除法、ABTS 自由基清除法、FRAP 测定法等体外抗氧化试验结果表明，苘麻叶总鞣质具有良好的抗氧化活性。

参考文献：

[1]施昆明,李春英,李朝,等.苘麻化学成分研究进展[J].黑龙江医药,2015,28(2):223–227.

[2]毛淑杰.中药鞣质成分的药理研究概述[J].中成药研究,1985(5):22–24.

[3]OLCHOWIK-GRABAREK E,MAKAROVA K,MAVLYANOV S,et al.Comparative analysis of BPA and HQ toxic impacts on human erythrocytes,protective effect mechanism of tannins (*Rhus typhina*)[J].Environmental Science and Pollution Research,2017,25(2):1200–1209.

[4]LIU H W,LI K,ZHAO J S,et al.Effects of chestnut tannins on intestinal morphology,barrier function,pro-inflammatory cytokine expression,microflora and antiox[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2017,doi:10.1111/jpn.12839.

[5]GUO Y J,ZHAO L,LI X F,et al.Effect of corilagin on anti-inflammation in HSV-1 encephalitis and HSV-1 infected microglias[J].European Journal of Pharmacology,2010,635(1/2/3):79–86.

[6] HAU D K,ZHU G Y,LEUNG A K,et al.*In vivo* anti-tumour activity of corilagin on Hep3B hepatocellular carcinoma[J].Phytomedicine,2010,18(1):11–15.

[7]KINOSHITA S,INOUE Y,NAKAMA S,et al.Antioxidant and heatoprotective actions of medicinal herb *Terminalia catappa* L. from Okinawa island and its tannin corilagin[J].Phytomedicine,2007,14(11):755–762.

[8]陈一燕,陈崇宏.柯里拉京药理活性研究进展[J].中国现代应用药学,2010,27(5):390–394.

[9]于占洋,金哲雄.鞣质抗氧化作用研究进展[J].黑龙江医药,2014,27(1):43–46.

[10]吴宁远,郭晓宇,陈建平,等.银露梅枝叶中鞣质的提取和含量测定[J].内蒙古医科大学学报,2014,36(1):35–38,43.

[11]中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典:二部[M].北京:中国农业出版社,2015.

[12]TIAN C L,ZHANG D X,YANG C X,et al.Research on extraction technology,antibacterial and antioxidant activity of ethanol extract from leaves of *AbutiLon theophrasti* medic[J].Acta Poloniae Pharmaceutica：Drug Research,2017,74(3):881–890.

[13]OLSZOWY M,DAWIDOWICZ A L.Essential oils as antioxidants:their evaluation by DPPH,ABTS,FRAP,CUPRAC,and β-carotene bleaching methods[J].Monatshefte für Chemie：Chemical Monthly,2016,147(12):2083–2091.

[14]邢晶晶,曹婷婷,杨帆,等.鞣质类化合物研究的进展情况[J].黑龙江医药,2011,24(5):776–780.

[15]CHANG C H,CHIU H F,HAN Y C,et al.Photoprotective effects of cranberry juice and its various fractions against blue light-induced impairment in human retinal pigment epithelial cells[J].Pharmaceutical Biology,2017,55(1):571–580.

[16]CHEN Y F,LI H Q,ZHANG S,et al.Anti-myocardial ischemia effect and components of litchi pericarp extracts[J].Phytotherapy Research,2017,31(9):1384–1391.

[17]ADAMCZYK B,SIMON J,KITUNEN V,et al.Tannins and their complex interaction with different organic nitrogen compounds and enzymes:old paradigms versus recent advances[J].ChemistryOpen,2017,6(5):610–614.

[18]韦正.橘果皮不同生长期主要活性成分动态变化规律研究[D].硕士学位论文.成都:成都中医药大学,2013.

A Research in Extraction Process and Antioxidant Activity of Total Tannin from *Abutilon theophrasti* Medic. Leaves

YANG Jie CHEN Xiaoyun GUO Yuru GAO Xiang TIAN Chunlian* LIU Mingchun

(*College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang* 110866*, China*)

Abstract: In order to investigate extraction process and antioxidant activity of total tannins from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves, single factor experiments and response surface experiments were established to optimize the extraction process of total tannins from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves, and antioxidant activities of total polyphenols, non-absorbed polyphenols and total tannins were determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl （DPPH） free radical scavenging assay, 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) （ABTS） free radical scavenging assay and Ferric ion reducing antioxidant power （FRAP） analysis. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: acetone concentration was 70%, the ratio of solvent to material （*V*/*m*） was 15.25:1.00 and the extraction time was 20 min. Under the above conditions, the yield of total tannins from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves collected in August, September, October was (1.41±0.05)‰, (1.77±0.03)‰ and (1.49±0.03)‰, respectively. Total tannins extracted from *Abutilon theophrasti* Medic. leaves showed good antioxidant activity. In conclusion, extraction processes with high extraction rate for *Abutilon theophrasti* Medic. leaves are obtained in the present study, and the extracted total tannins have high antioxidant activity.

Key words: *Abutilon theophrasti* Medic. leaves; total tannins; extraction technology; response surface; antioxidant activity

*Corresponding author, lecturer, E-mail: tianchunlian823@163.com （责任编辑 王智航）